

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

MIKROOKOLIŠ B LIMFOMA

MICROENVIRONMENT IN B LYMPHOMA

ZAVRŠNI RAD

Christine Supina

Preddiplomski sveučilišni studij Molekularna biologija

(Undergraduate study of Molecular Biology)

Mentor: doc.dr.sc. Petra Korać

Zagreb, 2015.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. MIKROOKOLIŠ TUMORA.....	2
2.1. Sastav mikrookoliša.....	3
3. SIGNALI ZA PREŽIVLJAVANJE I RAST.....	6
3.1. B- stanični receptor i <i>Toll-like</i> receptori.....	7
3.2. Signali iz stanica imunološkog sustava i stromalnih stanica.....	8
4. MEHANIZMI IZBJEGAVANJA IMUNOLOŠKOG ODOGOVORA I REZISTENCIJA NA TERAPIJU.....	10
5. TERAPEUTSKE MOGUĆNOSTI I PROGNOZE.....	13
6. ZAKLJUČAK.....	15
7. LITERATURA.....	16
8. SAŽETAK.....	16
9. SUMMARY.....	17

1. UVOD

B–stanični limfomi su tumori koji nastaju od razvojnih stadija B–limfocita, stanica koje ovise o brojnim interakcijama s imunološkim i stromalnim stanicama tijekom njihovog normalnog razvoja. Unatoč velikom broju studija koje kao glavne pokretače tumorigeneze detektiraju promjene genoma tumorskih stanica, uočeno je da tumorske stanice zadržavaju niz ovisnosti o interakcijama s ne-malignim stanicama i stromalnim elementima koji čine mikrookoliš tumora. Osnovno razumijevanje tih interakcija daje uvid u patogenezu većine B–limfoma i identificira nove terapijske mogućnosti za ciljanje onkogenih putova. Mikrookoliš ima glavnu ulogu tijekom progresije i metastaziranja tumora, i veliki utjecaj na efikasnost terapije. (Scott i Gascoyne, 2014.)

Limfomi su heterogena skupina tumora koja nastaje iz limfocita u razvoju, uglavnom u limfnim čvorovima, ali mogu nastati na bilo kojoj lokaciji gdje postoji limfno tkivo. Klasifikacija Svjetske Zdravstvene Organizacije (WHO, od eng. *World Health Organisation*) kategorizira limfome u više od 35 različitih entiteta, prvenstveno na temelju morfologije, imunofenotipa, genetskih promjena i kliničkih značajki. (Scott i Gascoyne, 2014.) Limfomi su peti najčešći oblik malignih tumora u Sjevernoj Americi, pojavljuju se s učestalošću od 22,5 na 100 000 osoba, a više od 90% pacijenata ima dijagnosticiran limfom podrijetla B–stanica. Značajan napredak u razumijevanju patogeneze i progresije limfoma postignut je kroz molekularnu analizu malignih stanica koja je identificirala genetske promjene i, posredno, aberacije unutarstaničnih putova. Prve mikroskopske analize Hodgkinova limfoma prije više od stoljeća otkrile su da ti tumori obuhvaćaju ne samo maligne stanice nego i mnoštvo ne-malignih stanica, uključujući genetički stabilne stromalne stanice, endotelne stanice, fibroblaste, imunosne stanice i ekstracelularni matriks, što zajedno čini mikrookoliš tumora. (Scott i Gascoyne, 2014.; Klemm i Joyce, 2015.)

2. MIKROOKOLIŠ TUMORA

Mikrookoliš B–limfoma sadrži velik, varijabilni broj imunskih stanica, stromalnih stanica, endotelnih stanica krvnih žila i komponenti izvanstaničnog matriksa, što uzrokuje promjene u arhitekturi tkiva. Proširenost, sastav i prostorni raspored mikrookoliša tumora vezani su za genetske promjene u malignim stanicama, stupanj do kojeg tumorske stanice ostaju ovisne o vanjskim podražajima za opstanak, proliferaciju i imunološku invaziju te za upalni odgovor u domaćina. (Scott i Gascoyne, 2014.; Blonska i dr., 2015.)

Međudnosi između ovi elemenata proizvode široki spektar tumorskih mikrookoliša koji se promatraju između, i u nešto manjoj mjeri, unutar podtipova limfoma, s tri glavna obrasca. Prvi obrazac je prikazan na primjeru folikularnog limfoma (FL, od eng. *follicular lymphoma*), limfoma koji pretežno zahvaća limfne čvorove u kojim maligne stanice zadržavaju znatan stupanj ovisnosti o razvojnim i proliferacijskim signalima mikrookoliša, barem u ranoj fazi bolesti. U mnogim slučajevima, sastav i prostorni raspored stanica unutar tumora nalikuje na normalno limfno tkivo, s neoplastičnim folikulima koji podsjećaju na reaktivne germinativne centre s folikularnim dendritičkim stanicama (FDC, od eng. *follicular dendritic cells*) i folikularnim T–pomoćničkim stanicama (T_{FH} stanice, od eng. *follicular T helper cells*). Drugi obrazac zabilježen je u klasičnom Hodgkinovom limfomu (CHL, od eng. *classical Hodgkin's lymphoma*), tumoru koji obuhvaća milijune ne-malignih stanica koje se razlikuju od sastava normalnog limfnog tkiva i koje okružuju rijetke maligne Hodgkinove Reed-Sternberg stanice (HRS stanice, od eng. *Hodgkin Reed–Sternberg cells*). Burkittov limfom (BL, od eng. *Burkitt's lymphoma*) predstavlja treći obrazac u kojem maligne stanice sadrže genetske aberacije, uključujući translokacije gena *MYC* i dodatne, kooperativne mutacije koje im daju jake stanično – autonomne signale za opstanak i proliferaciju pa tako smanjuju ovisnost tumorskih stanica o podražajima iz mikrookoliša. U tim limfomima mikrookoliš čine rijetke stanice, dok maligne stanice potiskuju normalno limfno tkivo u difuzni monotoni uzorak s makrofagima koji tkivu daju izgled zvjezdanog neba (od eng. *tingible – body macrophages*). Ove tumore karakterizira malobrojnost reaktivnih T–stanica. (Scott i Gascoyne, 2014.)

Identifikacija elemenata mikrookoliša se uglavnom oslanjala na morfologiju, imunohistokemiju (IHC, od eng. *immunohistochemistry*) i, u manjoj mjeri, protočnu citometriju. Poboljšana analiza

kompozicije mikrookoliša tumora povećat će se razvojem specifičnijih antitijela i primjenom tehnika za utvrđivanje profila genske ekspresije u staničnim podskupinama koje su izolirane protočnom citometrijom ili laserskom mikrodisekcijom. Primjer u kojem su ti pristupi poboljšali istraživanje mikrookoliša tumora je određivanje profila genske ekspresije CD4⁺T–stanica u klasičnom Hodgkinovom limfomu, koji pokazuju prevlast T1–pomoćničkih stanica (T_H1, od eng. *T helper 1 cells*) nad T2–skupinom. (Scott i Gascoyne, 2014.)

2.1. Sastav mikrookoliša

B–stanični limfomi najčešće nastaju u limfnom tkivu poput limfnih čvorova, no u manjem broju slučajeva javljaju se i ektranodalno. Sastav mikrookoliša predstavlja ostatke normalnog limfnog tkiva infiltriranog malignim stanicama i upalnim odgovorom domaćina. (Scott i Gascoyne, 2014.)

Formacija krvnih žila tijekom maligne progresije ključno je svojstvo malignih tumora stečeno u ranoj fazi tumorigeneze i smatra se njihovom glavnom oznakom. Ovaj događaj nije esencijalan samo zbog opskrbe tumora nutrijentima i kisikom zbog rasta i razvoja, već i zato što olakšava metastaziranje i širenje tumora. Uspoređujući ih s normalnim krvnim žilama, tumorske imaju promjenjenu anatomiju, strukturu i funkciju, uključujući povećanu vaskularnu permeabilnost. (Klemm i Joyce, 2015.)

Fibroblasti čine veliku skupinu ne-epitelnih ili stromalnih stanica unutar tumora. Njihovu proliferaciju stimuliraju faktori rasta i citokini kao što su FGF-2 i PDGF (od eng. *fibroblast growth factor 2* i *platelet-derived growth factor*) koji se nalaze u mikrookolišu. Fibroblasti predstavljaju izvor faktora rasta kao npr. faktora rasta vaskularnog endotela A (VEGF–A, od eng. *vascular endothelial growth factor A*), faktora koji potiče angiogenezu i vaskularnu permeabilnost, a također stvaraju i proupalne faktore koji potiču infiltraciju leukocita. (Klemm i Joyce, 2015.)

Mikrookoliš tumora čine i stanice prirođenog imunološkog sustava koje, ne samo da osiguravaju esencijalnu nespecifičnu obranu protiv patogena, već reguliraju tkivnu homeostazu i potiču ozdravljenje. (Klemm i Joyce, 2015.)

Ekstracelularni matriks proizvode svi tipovi stanica u mikrookolišu što rezultira stvaranjem mreže vlakana koja, ne samo da pruža strukturnu potporu, nego integrira i lokalne signale i regulira kretanje stanica, proliferaciju i diferencijaciju. Dok kolagen i fibronektin pružaju mehaničku potporu, proteoglikani doprinose povezivanju faktora rasta i citokina. Ekstracelularni matriks tumorskog mikrookoliša je drugačiji od strome normalnog tkiva i služi kao glavni izvor sudionika kemotaksije i procesa invazije tumorskih stanica. Povećana sinteza ekstracelularnog matriksa i umreženje kolagenih vlakana u stromi malignih stanica omogućuje invaziju tumorskih stanica. (Klemm i Joyce, 2015.)

Maligne stanice limfoma ekspiriraju kemokinske receptore i adhezijske molekule, a obrazac njihove ekspresije je u korelaciji s karakterističnim mjestom nastanka sekundarnih limfoma. Na primjer, CCR7, CXCR4 i CXCR5 su visoko ekspirirani u stanicama limfoma u podtipovima koji se pojavljuju u mreži čvorova, dok niska ekspresija CCR7 i CXCR5 u primarnom mediastinalnom B–staničnom limfomu (PMBCL, od eng. *primary mediastinal B cell lymphoma*) najvjerojatnije doprinosi lokalizaciji toga tumora na jednome mjestu. Ekspresija CCR7 je presudna za navođenje i lokalizaciju stanica limfoma u limfnim organima i za pristup faktorima preživljenja koji doprinose međudjelovanju između limfoma i stromalnih stanica na određenoj lokaciji. (Scott i Gascoyne, 2014.)

Maligne stanice u folikularnom limfomu koloniziraju reaktivni germinativni centar u folikulima limfnog čvora, stvarajući mjesto koje sadrži mnoge elemente potrebne za njihov opstanak i širenje. Prisutnost stanica folikularnog limfoma mijenja sastav limfnog tkiva u usporedbi s reaktivnim germinativnim centrima te direktno i indirektno privlači limfocite i mijenja njihov fenotip. Najistaknutiji je porast količine CD4⁺ T–staničnih podtipova, koji imaju povećan broj T_{FH} stanica, regulatornih T–stanica (T_{reg}, od eng. *regulatory T cells*) i folikularnih regulatornih T–stanica (TFR, od eng. *follicular regulatory T cells*). Stanice folikularnog limfoma upravljaju diferencijacijom CD4⁺T–stanica, usmjeravajući razvoj populacije unutar tumora prema T_{reg} stanicama, suprotno od smjera T_H17 stanica. Ovaj proces je posredovan ekspresijom molekula koje su uključene u kostimulaciju T–stanica, uključujući CD70, CD80 i CD86. Činjenica da stanice limfoma ekspiriraju velike količine CD70 (za razliku od normalnih B–stanica) dodatno

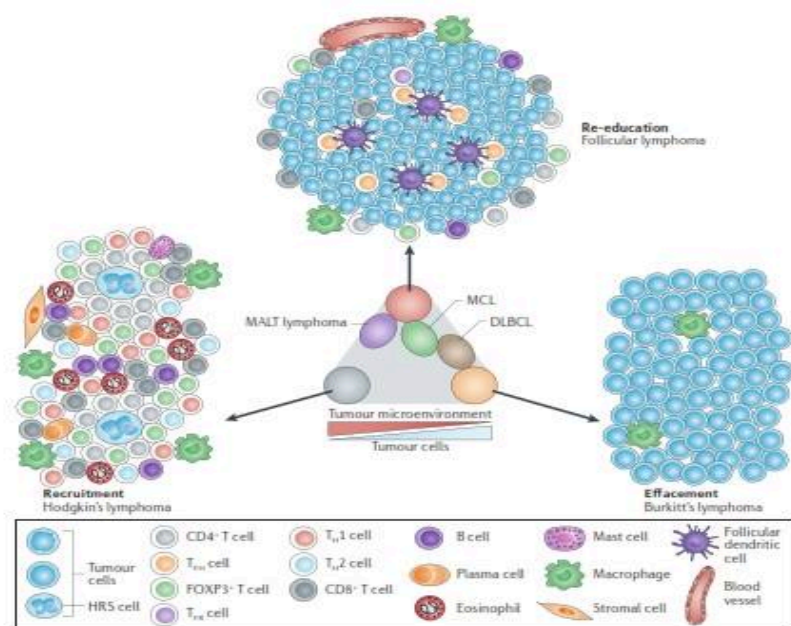
podupire ovaj mehanizam. (Scott i Gascoyne, 2014.) Stanice folikularnog limfoma mogu aktivno djelovati i na T_{reg} stanice, premještajući ih iz njihove normalne interfolikularne lokacije u maligne folikule izlučujući CCL22.

U folikularnom limfomu, lezije u koštanoj srži sadrže mnoge stanične komponente nađene u malignim folikulima, uključujući organizirane stromalne elemente koji nalikuju na fibroblasne retikularne stanice (FRC, od eng. *fibroblastic reticular cells*) i folikularne dendritičke stanice (FDC, od eng. *follicular dendritic cells*). S obzirom na to da ti specifični stromalni elementi nisu nađeni u normalnoj koštanoj srži, pretpostavlja se da su njihovu prisutost izazvale maligne stanice. (Scott i Gascoyne, 2014.)

Mehanizmi odgovorni za dominantnost pojedinih komponenti mikrookoliša u klasičnom Hodgkinovom limfomu uglavnom se razlikuju od onih u folikularnom limfomu. (Slika 1.) Raznolikost u milijunima stanicama imunološkog sustava, kao i varijabilni broj stanica strome i fibroblasta, najvjerojatnije su uzrokovani nizom kemokina i citokina koji su proizvedeni kao odgovor na HRS-stanice. Među stanicama unutar klasičnog Hodgkinovog limfoma ističu se T -stanice, pogotovo T_H i T_{Reg} stanice. CCL5, CCL17 i CCL22 privlače $CCR4^+$ stanice prema HRS-stanicama. Istovremeno, interleukin 5 (IL-5), kojeg proizvode HRS-stanice, privlači eozinofile. Izlučivanje faktora stimulacije kolonija 1 (CSF1, od eng. *colony-stimulating factor 1*) i CX3CL1 (od eng. *fractalkine*) iz HRS-stanica utječe na promjenjivu infiltraciju makrofaga. Interleukin 8 (IL-8) iz makrofaga dalje privlači neutrofile. (Scott i Gascoyne, 2014.)

Genetička pozadina Burkittovog limfoma je translokacija gena *MYC* i neke od regulatornih regija imunoglobulinskih gena uz dodatne genetske promjene koje uzrokuju malignu transformaciju. Nedavna istraživanja Burkittovog limfoma identificirala su mutacije raznih gena, uključujući *ID3*, *TCF3*, *CCND3* i *TP53*. Promjene gena *MYC*, člana obitelji transkripcijskih faktora jezgre, u B-staničnim limfomima često su povezane s *BCL2* (od eng. *B-cell lymphoma 2*) i *BCL6* (od eng. *B-cell lymphoma 6*) translokacijama. (Bosch i Fischer, 2014.) U slučaju ovog limfoma genetičke promjene tumorskih stanica uzrokuju promjenu signala koji im omogućavaju jaku autonomnost pa su ovdje i količina i sastav mirookoliša gotovo neznatni.

Fenotip stanica limfoma, koji je rezultat stečenih genetskih aberacija u skladu s rezidualnom biologijom limfocita, određuje mjesta djelovanja limfoma kao i sadržaj mikrookoliša – to je karakteristika koja je temelj za prepoznavanje histologije tumora. (Scott i Gascoyne, 2014.)



Slika 1. Shematski prikaz sastava mikrookoliša B-staničnih limfoma. Podtipovi limfoma predstavljaju niz tumorskih tkiva s različitim sadržajem tumorskih stanica, u rasponu od ~ 1% u Hodgkinovom limfomu do, više od 90%, u Burkittovom limfomu. (preuzeto iz Scott i Gascoyne, 2014.)

3. SIGNALI ZA PREŽIVLJAVANJE I RAST

Stanice limfoma pokazuju široki raspon ovisnosti o signalima za rast i razvoj iz mikrookoliša. To pokazuju i pokušaji uspostavljanja stanične linije limfoma, što je bilo uspješno s kulturom stanica difuznog B–velikostaničnog limfoma (DLBCL, od eng. *diffuse large B cell lymphomas*), ali neuspješno kod kulture stanica folikularnog limfoma i limfoma stanica limfnog tkiva pridruženog sluznici želuca (MALT, od eng. *gastric mucosa-associated lymphoid tissue*) gdje je bila uočena brza smrt stanica. Stvaranje staničnih linija Hodgkinova limfoma također se pokazalo izazovom. Kasnije je pokazano da se dodatkom potpornih elemenata, kao što su

T–stanice i stromalne stanice iz mikrookoliša, može prevladati apoptoza koja se događala u kulturama folikularnog limfoma i limfoma tkiva pridruženog sluznici želuca. (Scott i Gascoyne, 2014.)

3.1. B–stanični receptor (BCRs) i *Toll–like* receptori (TLRs)

B–stanicama je za opstanak nužan funkcionalan B–stanični receptor - gubitak ekspresije BCR-a dovodi do brze stanične smrti kroz povećanu ekspresiju CD95. Dva su glavna načina BCR signalizacije: tonična signalizacija, koja podržava opstanak mirujućih zrelih B–stanica kroz putove koji su aktivirani s PI3K te aktivna signalizacija, koja se javlja nakon pojave antigena i aktivira nuklearni faktor- κ B (NF- κ B) pomoću kaspaze. Linearna ubikvitinacija, novo identificirana posttranslacijska modifikacija, katalizirana je linearnim ubikvitinskim kompleksom koji se sastoji od 3 podjedinice – HOIL -1L, HOIP i SHARPIN. Ubikvitinski kompleks ima glavnu ulogu u aktivaciji NF- κ B, potaknutog s nekoliko faktora uključujući faktor tumorske nekroze α (TNF- α , od eng. *tumor necrosis factor- α*) i interleukin 1 β (IL-1 β). Aktivnost kompleksa je nužna za funkciju B–stanica, a hiperaktivacija je povezana s onkogeneom u određenim oblicima B–limfoma. (Sasaki i dr., 2015.)

Tumorske stanice u većini tipova limfoma održavaju površinsku ekspresiju BCR-a, s iznimkom kod klasičnog Hodgkinovog limfoma (CHL) i primarnog medijastinalnog B–staničnog limfoma (PMBCL). Postoje dvije glavne hipoteze o izvoru mikrookoliša tijekom stimulacije BCR u limfomima. (Scott i Gascoyne, 2014.)

Prva je da BCR prepoznaje vlastite antigene i to je uočeno u nešto više od jedne četvrtine folikularnih limfoma. Polireaktivni B–stanični receptori koji vežu vlastite antigene, kao i antigen bakterije *Helicobacter pylori*, imaju važnu ulogu u patogenezi limfoma želuca i mogu se vidjeti u nekim drugim limfomima pridruženim sluznicama. (Scott i Gascoyne, 2014.)

Druga hipoteza je da je stimulacija BCR-a neovisna o sudjelovanju antigena. Istraživanja imunoglobulinskih gena u folikularnim limfomima otkrila su još jedan potencijalni mehanizam BCR–signalizacije: više od 80% tih gena sadrže motive koji mogu djelovati kao akceptorska mjesta za N–glikozilaciju. Glikanski lanci završavaju manozom što je neobično za glikoproteine koji su eksprimirani u stanicama u mikrokolišu, uključujući dendritičke stanice i makrofage.

Pretpostavlja se da stjecanje tih motiva može biti definirajući korak u transformaciji „normalnih“ B–stanica, u kojima bi se događala translokacija, u stanice folikularnog limfoma. Neki od agresivnih limfoma sadrže genetske mutacije koje amplificiraju vanjske BCR–signale. U aktiviranim B–sličnim stanicama podtipa difuznog B–velikostaničnog limfoma te mutacije dovode do kronične NF– κ B aktivacije. U Burkittovom limfomu, druge mutacije rezultiraju signalizacijom koja sliči toničnoj BCR–signalizaciji. Te mutacije su vjerojatno temelj relativne malobrojnosti elemenata mikrookoliša u navedenim tumorima. (Scott i Gascoyne, 2014.)

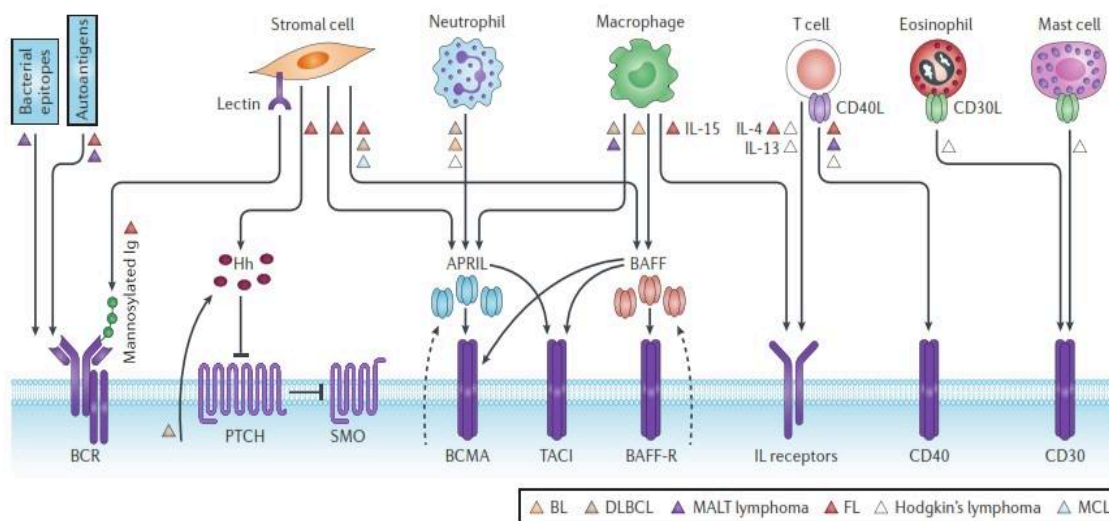
Toll – like receptori su proteini koji prepoznaju konzervirane molekule mikroba i imaju važnu ulogu u prirođenom imunološkom sustavu. Mutacije u mijeloidnom diferencijacijskom primarnom odgovoru 88 (*MYD88*, od eng. *myeloid differentiation primary response 88*), adaptorskom proteinu koji privlači Toll–receptore prema aktivaciji NF– κ B, promatrane su u nekoliko tipova limfoma. Nedavna istraživanja sugeriraju da mutacije u *MYD88* ne utječu na autonomnu aktivaciju NF– κ B, već da pojačavaju efekt uzvodne aktivacije TLR9 (*Toll-like receptor 9*). S obzirom da TLR9 može prepoznati nukleinske kiseline, postoji mogućnost da je proliferacija MALT i DLBCL limfoma potaknuta prisutnošću nukleinskih kiselina u tumorskom mikrookolišu. (Scott i Gascoyne, 2014.)

3.2. Signali iz stanica imunološkog sustava i stromalnih stanica

U prilog ovisnosti B–stanica o BCR–signalizaciji govore eksperimenti s ranim staničnim kulturama koji su otkrili da stanice folikularnog limfoma i stanice MALT limfoma želuca pokazuju ovisnost o signalima T–stanica za razvoj i proliferaciju. Proliferacijski signali zahtijevaju stanični kontakt. *In vitro* istraživanja na folikularnom limfomu pokazala su da je princip ovih interakcija prezentiranje antitijela koja vežu CD40 na fibroblaste. Mikrookoliš folikularnog limfoma je obogaćen T_{FH} stanicama što dovodi do interakcija posredovanih s CD40 u germinativnom centru tijekom normalnog razvoja B–stanica. U eksperimentima na ranim staničnim kulturama, dodatak IL–4 pojačao je proliferaciju stanica limfoma. Usporedba između tumorskog i normalnog B–staničnog okoliša otkrila je IL–4 put koji uključuje aktivaciju STAT–6 i prekomjernu ekspresiju IL–4 nizvodno od ciljanih gena u folikularnom limfomu. Ove studije podupiru prethodne tvrdnje da stanice folikularnog limfoma imaju visoku razinu IL–4 i da

T_{FH} stanice potiču IL–4 stimulaciju prema razvoju malignih stanica na parakrinoj razini. IL–15 koji prezentiraju makrofagi, uz CD40 interakcije s T_{FH} stanicama, pridonosi proliferaciji tumorskih stanica aktivirajući STAT–5. Imunološke stanice izlučuju BAFF i APRIL koji su članovi superporodice TNF, a koji su potrebni za normalni razvoj B–stanica. U MALT limfomu želuca, makrofagi povezani s tumorom (TAM, od eng. *tumor-associated macrophages*) u blizini stanica limfoma izlučuju velike količine liganda APRIL, dok neutrofili izlučuju APRIL u klasičnom Hodgkinovom limfomu, difuznom B–velikostaničnom limfomu i Burkittovom limfomu. U Burkittovom limfomu makrofagi izlučuju BAFF, a kokultivacija makrofaga sa stanicama limfoma povećava sekreciju BAFF-a. (Slika2.) (Scott i Gascoyne, 2014.)

U skladu s CD40 stimulacijom i aktivacijom IL–4 puta, stanična kultura folikularnog limfoma poboljšana je dodatkom stromalnih stanica. Istraživanja su pokazala da vezanje za stromalne stanice štiti stanice limfoma od apoptoze i potiče rast u folikularnom limfomu i limfomu stanica plaštene zone (MCL, od eng. *mantle cell lymphoma*). Kod miša, stromalne stanice stvaraju IHH (od eng. *Indian Hedgehog*). Prilikom kokultivacije s inhibitorima Hedgehog puta uočeno je da je zaštitna uloga stromalnih stanica prekinuta. Upotreba ovih inhibitora značajno je smanjila ekspanziju tumora, naglašavajući važnost ovih elemenata u *in vivo* sustavima. U folikularnom limfomu, Hedgehog uglavnom producira folikularne dendritičke stanice. Ostale stromalne stanice izlučuju BAFF koji *ex vivo* štiti stanice difuznog B–velikostaničnog limfoma i stanice limfoma plaštene zone od spontane apoptoze. (Scott i Gascoyne, 2014.)



Slika 2. Shematski prikaz signala za preživljavanje i proliferaciju. Slika prikazuje izbor interakcija između elemenata mikrookoliša i receptora stanica limfoma. Hedgehog ligande (Hh) proizvode stromalne stanice ili tumorske stanice, ovisno o tipu limfoma, a vežu se za Patched–receptore. Neke stanice limfoma izlučuju BAFF i APRIL. IL-13 izlučuju Hodgkin Reed–Sternberg stanice, ali i $CD4^+$ T–stanice. (preuzeto iz Scott i Gascoyne, 2014.)

4. MEHANIZMI IZBJEGAVANJA IMUNOLOŠKOG ODGOVORA I REZISTENCIJA NA TERAPIJU

Tijekom prošlog desetljeća otkriveno je da interakcije između stanica limfoma i mikrookoliša doprinose sposobnosti stanica limfoma da izbjegnu antitumorski imunološki odgovor domaćina. Ti mehanizmi uključuju promijenjenu ekspresiju površinskih molekula na stanicama limfoma koje su uključene u interakciju s imunološkim stanicama. Stanice B–staničnog limfoma su antigen-prezentirajuće stanice koje ekspimiraju molekule kompleksa histokompatibilnosti razreda II (MHC II, od eng. *histocompatibility complex class II molecules*) na svojoj površini da bi omogućile prezentiranje antigena T–stanicama. Do sad su otkrivena 3 mehanizma koja dovode do smanjene regulacije MHC II, a pojavljuju se u različitim podtipovima limfoma. (Scott i Gascoyne, 2014.)

Kod limfoma koji se pojavljuju u centralnom živčanom sustavu, više od 50% ne eksprimira MHC II proteine, a većina ovih tumora ima homozigotnu deleciju *MHC II* gena na kromosomu 6. (Scott i Gascoyne, 2014.)

U mnogim slučajevima klasičnog Hodgkinovog limfoma i primarnog medijastinalnog B–staničnog limfoma poremećaj u MHC II i transaktivatoru, glavnom regulatoru ekspresije MHC II, putem kromosomske translokacije dovode do smanjene regulacije transkripcije MHC II. (Slika 3.a) Mehanizmi kojima gubitak MHC II ekspresije dovodi do izbjegavanja imunološkog odgovora mogli bi se koristiti za smanjivanje količine CD4⁺T_H stanicama povezanih s tumorskim antigenima što bi aktiviralo citotoksične T–limfocite (CTL, od eng. *cytotoxic T lymphocytes*). (Scott i Gascoyne, 2014.)

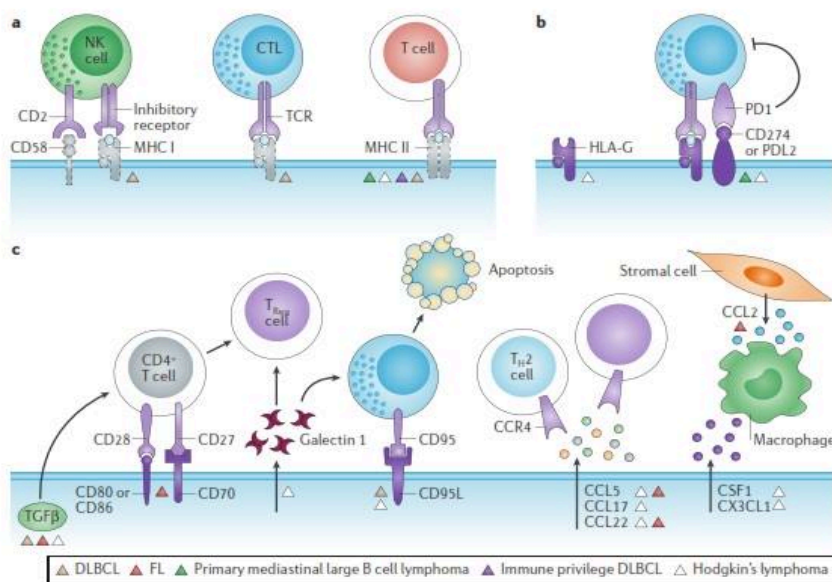
Sekvenciranje novih generacija (NGS, od eng. *next – generation sequencing*) DLBCL-a pokazalo je mutacije u $\beta 2$ –mikroglobulinu (B2M, od eng. *$\beta 2$ –microglobulin*), dijelu MHC I molekule koji je potreban za prepoznavanje tumorskih stanica od strane citotoksičnih T–limfocita. 75% B–staničnih limfoma pokazuje poremećaj u površinskoj ekspresiji B2M, od čega 50% ovih tumora sadrži genetske mutacije ili delecije. Iako gubitak MHC I daje mogućnost imunosnog bijega od citotoksičnih T–limfocita, stanice koje nemaju MHC I meta su za uništenje prirodno ubilačkim stanicama (NK, od eng. *natural killer cells*). (Scott i Gascoyne, 2014.)

Doprinos imunološkom bijegu putem aberantne ekspresije površinskih molekula najviše je istaknut u klasičnom Hodgkinovom limfomu i primarnom medijastinalnom B–staničnom limfomu. Ovi tipovi limfoma ekspimiraju CD274 i PDL2 – ligande koji se vežu za PD1 na CD4⁺ T–stanicama i CTL–stanicama, dovodeći T–stanice u stanje iscrpljenja. Ostali primjeri imunosnog bijega putem regulacije staničnih površinskih molekula uključuju ekspresiju HLA–G, koji je netipična MHC I molekula s inhibitrnim učinkom na NK– i CTL–stanice i ekspresiju CD95L koji potencijalno inducira apoptozu u citotoksičnim T–stanicama specifičnim za tumor. (Slika 3.) (Scott i Gascoyne, 2014.)

Osim mehanizama izbjegavanja imunološkog odgovora promjenom ekspresije površinskih molekula, neki tipovi limfoma pokazuju i otpornost na terapiju posredovanu mikrookolišem koja može biti podijeljena u dva tipa. Inherentna ili intrinzična otpornost je prisutna prije primjene

lijekova ili radioterapije. Ovaj tip otpornosti je baziran na mnoštvu već postojećih recipročnih interakcija između tumorskih stanica i okružujućeg mikrookoliša. Stečena mikrookolišna otpornost se razvija kao odgovor na efekte terapije i definirana je adaptivnim domaćinskim odgovorom na liječenje. (Klemm i Joyce, 2015.)

Interakcija stromalnih stanica i stanica limfoma smanjuje apoptozu kod odgovora na citotoksične lijekove u *ex vivo* stanicama DLBCL-a i MCL-a, što je posredovano aktivacijom signalizacije NF- κ B. Rezistencija na lijekove u stanicama limfoma plaštene zone je ovisna o adheziji MCL stanica na stromalne stanice. Tumorske stanice migriraju ispod stromalnih stanica u procesu ovisnom o kemokinu CXCR4 i VLA-4 integrinu. Prilikom kokultivacije ovih stanica, ne-adherentne stanice limfoma bile su osjetljive na apoptozu induciranu lijekovima. (Scott i Gascoyne, 2014.) Postoje dokazi da topivi faktori izlučeni iz stanica u mikrookolišu, u odgovoru na stanice limfoma, dovode do rezistencije na lijekove. Eksperimenti kokultivacije stanica limfoma i stromalnih stanica pokazali su prisutnost topivog faktora BAFF i njegovo pojačano izlučivanje iz stromalnih stanica u kontaktu s limfocitima. Ovi eksperimenti su pokazali i da direktan efekt stromalnih stanica na stanice limfoma dovodi do rezistencije – primjer tog procesa je stanična otpornost posredovana adhezijom, u kojoj indukcija miR-181a u stanicama limfoma, koje su vezane za FDC–stanice, dovodi do redukcije proapoptotskog proteina BIM. Direktni stanični kontakt stanica limfoma sa stromalnim stanicama također dovodi do redukcije miR-548m u stanicama limfoma, dovodeći do pojačanja signala za preživljavanje, uključujući aktivaciju transkripcijskog faktora MYC i histonske deacetilaze 6. Adhezija stanica limfoma na stromalne stanice inducira zaustavljanje staničnog ciklusa što ukazuje na to da su takve dormantne stanice rezistentnije na citotoksične lijekove. (Scott i Gascoyne, 2014.; Klemm i Joyce, 2015.)



Slika 3. Shematski prikaz interakcija tumorskih stanica s mikrookolišem koje omogućuju imunološki bijeg. A) primjer površinskih molekula kompleksa histokompatibilnosti razreda MHC I i MHC II koje su uključene u interakcije s imunološkim sustavom B) površinske molekule koje smanjuju antitumorsku imunosnu funkciju. Ligandi PD1 pružaju inhibicijski signal T–stanicama, a HLA–G smanjuje funkciju imunološkog sustava. C) Mehanizmi uključeni u modulaciju sastava mikrookoliša prema imunološkoj toleranciji. Općenito, ovi mehanizmi uključuju upravljanje diferencijacijom CD4⁺ T–stanica prema imunosupresivnim regulacijskim T–stanicama (T_{reg}), smanjujući broj citotoksičnih T–limfocita (CTL). (preuzeto iz Scott i Gascoyne, 2015.)

5. TERAPEUTSKE MOGUĆNOSTI I PROGNOZE

Unatoč varijabilnosti opsega i sastava tumorskog mikrookoliša u različitim podtipovima limfoma, istraživanja profiliranja genske ekspresije napravljena na temelju biopsije tkiva u klasičnom Hodgkinovom, difuznom B–velikostaničnom i folikularnom limfomu pokazala su da su komponente mikrookoliša koje se mogu odrediti pri dijagnozi značajno povezane s konačnim ishodom bolesti. (Scott i Gascoyne, 2014.)

U klasičnom Hodgkinovom limfomu, pacijenti imaju povećani broj infiltrirajućih makrofaga povezanih s tumorom, citotoksičnih T–limfocita i prirodno-ubilačkih stanica te mali broj T_{Reg} i B–stanica. U difuznom B–velikostaničnom limfomu, dva profila genske ekspresije iz ne-malignih stanica povezana su s ishodom tretmana kod R-CHOP terapije. Stromalni element 1 uključuje gene koji su eksprimirani u komponentama ekstracelularnog matriksa i monocita i koji su povezani s pozitivnim ishodom nakon tretmana s R-CHOP-om. Stromalni element 2 koji je povezan s endotelnim stanicama povezan je i s negativnim ishodom liječenja. U folikularnom limfomu, opisana su dva mikrookolišna elementa sa suprotnim učincima na ishod terapije - imunosni odgovor 1, koji je povezan sa duljim preživljenjem, obihvaća gene koji kodiraju markere T–stanica i gene koji su visoko eksprimirani u makrofagima. Imuni odgovor 2, povezan s negativnim ishodom, uključuje gene koji su visoko eksprimirani u makrofagima i dendritičkim stanicama. (Scott i Gascoyne, 2014.)

Vrlo je vjerojatno da su stečene somatske mutacije u stanicama limfoma odlučujući faktori koji određuju kompoziciju stanica u mikrookolišu. Znanje o podržavajućim interakcijama između stanica limfoma i stanica mikrookoliša je otkrilo brojne putove kroz koje ove interakcije mogu postati meta za razvoj specifičnijih terapija limfoma. Ova metoda je primjenjena kod MALT limfoma želuca u kojem je upotreba antibiotika protiv *H.pylori* uzrokovala regresiju limfoma i izlječenje kod većine pacijenata. (Scott i Gascoyne, 2014.)

Ostali pristupi koji su bili uspješni u reduciranju potpore mikrookoliša tumorskim stanicama i primjenjeni kod ljudi uključuju blokiranje staničnih površinskih molekula i njihovih nizvodnih unutarstaničnih putova, što je omogućilo poboljšavanje funkcije imunih efektorskih stanica i narušavanje neoangiogeneze. (Scott i Gascoyne, 2014.)

Trenutni fokus pristupa kojem je meta mikrookoliš je poboljšanje funkcije imunskih efektorskih stanica. Na taj način želi se povećati efikasnost imunoterapije i potaknuti postojeću endogenu antitumorsku imunost. Pristupi koji pokušavaju poboljšati funkciju T–stanica uključuju blokadu imune ključne točke s antitijelima za protein 4 povezan s CTL (CTLA–4, od eng. *CTL-associated protein 4*) i PD1. Poboljšanje funkcije makrofaga je također zanimljiv pristup s obzirom na to da ove stanice imaju glavnu ulogu u terapijama s antitijelima. (Scott i Gascoyne, 2014.)

Drugo područje trenutnog interesa je ciljanje tumorske angiogeneze. Gustoća krvnih žila (MVD, od eng. *microvessel density*), mjera za tumorsku neoangiogenezu, u limfomima je ekvivalentna ili viša nego u reaktivnim limfnim čvorovima i povećava se od manje agresivnih (FL) prema više agresivnim tipovima limfoma (DLBCL i BL). VEGF-A, najistaknutiji proangiogeni faktor, eksprimiran je u stanicama limfoma kod difuznog B-velikostaničnog limfoma i limfoma stanica plaštene zone. Povezanost između ekspresije gustoće krvnih žila i VEGF-A u stanicama limfoma još nije otkrivena. Novi alternativni pristup je mobilizacija stanica limfoma dalje od njihovih tumor- podupirajućih niša, što smanjuje vijabilnost i povećava osjetljivost na lijekove. Inicijalna ideja za ovaj pristup dolazi iz efekta specifičnih CXCR4 antagonista koji mobiliziraju stanice limfoma u krvotok i produžuju preživljavanje i monoterapiju. (Scott i Gascoyne, 2014.)

6. ZAKLJUČAK

Donedavno je uloga mikrookoliša u razvoju B-limfoma bila podcijenjena. Otkrivene genske mutacije, aberacije i translokacije u stanicama limfoma smatrale su se glavnim pokretačima tumorigeneze sve dok nije stavljen naglasak na važnost interakcija tumorskih i mikrookolišnih stanica kao dominantnog mehanizma onkogeneze kod većine limfoma. Nove metode istraživanja, kao npr. sekvenciranja novih generacija, pokušat će istražiti ko-evoluciju malignih stanica i tumorskog mikrookoliša, pogotovo evolucijski pritisak koji međusobno stvaraju. Folikularni limfom je idealan model za proučavanje tih međuodnosa zbog specifične arhitekture tkiva koje zahvaća. Uz to, ovaj indolentni limfom ima mogućnost transformacije u agresivne limfome, pogotovo difuzni B-velikostanični limfom, pa može pomoći pri identifikaciji genetskih alternacija koje ukidaju potporu tumorskih stanica u mikrookolišnim interakcijama. Iako otkrivanje biologije tumora može biti veliki izazov, cilj je obuhvatiti sve njene aspekte i pronaći specifične lijekove za, npr. interferiranje komunikacije tumora i mikrookoliša i tako poboljšati preživljenje i kvalitetu oboljelih.

7. LITERATURA

Scott,D.W., Gascoyne, R.D. (2014.) *The tumour microenvironment in B cell lymphomas*. Nature Reviews Cancer

Klemm,F., Joyce, J.A. (2015.) *Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer*. Memorial Sloan Kettering Cancer Center. New York,USA.

Sasaki,K., Kazauhiro,I. (2015.) *Roles of linear ubiquitinylation,a crucial regulator of NF- κ B and cell death,in the immune system*. Immunological Reviews.

Blonska M., Agarwal,N.K., Vega F. (2015.) *Shaping of the tumour microenvironment : Stromal cells and vessels*. Seminars in Cancer Biology.

Bosch-Krankenhaus,R., Fischer-Bosch,M. (2014.) *Impact of MYC on malignant behavior*. Institute of Clinical Pharmacology, Germany.

8. SAŽETAK

B–limfomi se razvijaju u specijaliziranim tkivima kao što su koštana srž i sekundarni limfni organi, limfni čvorovi i slezena. Dugo su bili istraživani kao bolest uzrokovana genomskim nestabilnostima, kromosomskim alternacijama, genetičkim mutacijama i sl., no danas je jasno da su promjene u tumorskim stanicama i pod utjecajem ne-malignih, stromalnih stanica mikrookoliša. Mikrookoliš limfoma karakterizira heterogena populacija stromalnih stanica, uključujući fibroblastne retikularne stanice, mezenhimalne matične stanice, folikularne dendritičke stanice, i stanice imunološkog sustava kao što su makrofagi, T– i B–stanice. Navedene stanične populacije komuniciraju sa stanicama limfoma i tako omogućavaju rast tumora i razvijanje otpornosti na lijekove putem mnogih mehanizama. U kontekstu maligne progresije, mikrookoliš ima utjecaj na terapijski ishod na više razina, u pozitivnom ili negativnom smislu. Napredne laboratorijske metode i bioinformatički alati kojima se mogu razlikovati subpopulacije u kompleksnom tkivu i identificirati faktori komunikacije tumorskih i ne-tumorskih stanica mikrookoliša, mogu dovesti do novih spoznaja o potencijalnim terapijskim strategijama „dvostrukog udarca“.

9. SUMMARY

B-lymphomas develop and progress in a specialized tissue microenvironment such as bone marrow or secondary lymphoid organs such as lymph node and spleen. While malignant neoplasms were long considered diseases defined and driven by genomic instability, chromosomal alterations, and genetic mutations, today influence of nonmalignant, stromal cells of the tumour microenvironment is also appreciated. The lymphoma microenvironment is characterized by a heterogeneous population of stromal cells, including fibroblastic reticular cells, mesenchymal stem cells, follicular dendritic cells, and inflammatory cells such as macrophages, T- and B-cells. These cell populations interact with malignant cells and promote lymphoma growth, survival and drug resistance through multiple mechanisms. In the context of malignant progression, the tumour microenvironment has multifaceted ability to influence therapeutic outcome in either a positive or a negative manner. Advanced laboratory techniques and bioinformatic tools can differ subpopulations in complex tumor tissues and thus identify factors important in tumor and non-tumor cell communication in order to provide new insights into potential 'doublehit' therapeutic strategies.